

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A OBSERVAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E ENDOFÍTICOS DO TIPO *DARK SEPTATE* EM ESPÉCIES NATIVAS DE CERRADO⁽¹⁾

Kelly da Silva Coutinho Detmann⁽²⁾, Marina Neves Delgado⁽³⁾, Vitor Paiva Alcoforado Rebello⁽⁴⁾, Tiago de Souza Leite⁽⁵⁾, Aristéa Alves Azevedo⁽⁶⁾, Maria Catarina Megumi Kasuya⁽⁷⁾ & Andrea Miyasaka de Almeida⁽⁸⁾

RESUMO

As espécies vegetais de Cerrado *sensu stricto* apresentam estratégias adaptativas às condições edáficas e climáticas de altos investimentos em fotoassimilados, nutrientes e água para sua estruturação. A simbiose entre fungos e raízes de plantas é uma importante adaptação radicular que auxilia as plantas na absorção de nutrientes e água do solo, sendo determinantes para a sobrevivência no Cerrado. Com o objetivo de estudar fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e fungos endofíticos do tipo *dark septate* (DSEFs) nas raízes de algumas espécies arbóreas e herbáceas, nativas do Cerrado *sensu stricto*, foram testados diferentes métodos para melhor observação das estruturas fúngicas em simbiose. O melhor método de clarificação foi observado quando as raízes foram autoclavadas a 121 °C em KOH 2 %, por 20 min, e com a subsequente transferência para solução nova de KOH 2 %, por 24 h, em temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido e, em seguida, essas amostras foram imersas em H₂O₂ 2 % por 2 h. Os arbúsculos foram observados com maiores detalhes após a inclusão em resina, seccionamento e coloração com azul-de-toluidina. Todas as espécies avaliadas encontravam-se colonizadas por FMAs, e apenas em *Xylopia aromatica* não se observaram os DSEFs.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal do primeiro autor, a ser apresentada à Universidade Federal de Viçosa – UFV. Trabalho financiado pela FAPEMIG e PESCO (Programa de Pesquisas Ecosociais no Cerrado). Recebido para publicação em maio de 2007 e aprovado em julho de 2008.

⁽²⁾ Mestrando em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa – UFV. Av. PH Rolfs s/n, CEP 36570-000 Viçosa (MG). Bolsista CNPq e PESCO. Email: coutinhokelly@yahoo.com.br

⁽³⁾ Mestrando em Botânica, UFV. Bolsista CNPq. Email: mnevesdelgado@hotmail.com

⁽⁴⁾ Graduando em Agronomia, UFV. Bolsista PIBIC/CNPq. Email: vitoralcoforado@gmail.com

⁽⁵⁾ Graduando em Ciências Biológicas, UFV. Bolsista PIBIC/CNPq e PESCO. Email: tiagoleiteufv@gmail.com

⁽⁶⁾ Professor Associado 1, Departamento de Biologia Vegetal, UFV. Bolsista CNPq. Email: aazevedo@ufv.br

⁽⁷⁾ Professor Associado 1, Departamento de Microbiologia, UFV. Bolsista CNPq. Email: mksuya@ufv.br

⁽⁸⁾ Professor Adjunto 2, Departamento de Biologia Vegetal, UFV. Email: amalmeida@ufv.br

As espécies herbáceas apresentaram maiores frequências de colonização micorrízica do que as arbóreas. O caráter generalista dos FMAs e DSEFs observado nas espécies vegetais do Cerrado *sensu stricto* sugere a importância dessas simbioses como mecanismo adaptativo às condições de Cerrado.

Termos de indexação: colonização micorrízica, FMA, DSEF, herbáceas, arbóreas.

SUMMARY: *COMPARISON OF METHODS TO VISUALISE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL AND DARK SEPTATE ENDOPHYTIC FUNGI IN NATIVE CERRADO SPECIES*

*Plant species in sensu stricto Cerrado have adaptive strategies to soil and climatic adversities that require high investment of nutrients, water and photoassimilates. The mutualistic fungi - plant root symbiosis is an important adaptation by which plants can improve soil nutrients and water acquisition and it can be determinant for plant survival in Cerrado conditions. The aim of this study was to establish a method for studying arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and dark septate endophytic fungi (DSEF) in roots of some tree and shrub species in stricto sensu Cerrado. The best method for root clarification was obtained after autoclaving root samples with 2 % KOH for 20 min followed by incubation in a new 2 % KOH solution for 24 h at room temperature. This procedure was repeated once and subsequently the samples were immersed in 2 % H₂O₂ for 2 h. The arbuscules were thoroughly examined after resin inclusion, sectioned and stained with toluidine blue. All plant species evaluated were associated to AMF and all but *Xylopia aromatica* were associated to DSEF as well. The mycorrhizal frequency in shrubs was higher than in tree species. The widespread occurrence of AMF and DSEF symbioses suggests that they represent an important adaptation to environmental factors in the Cerrado region.*

Index terms: mycorrhizal colonization, AMF, DSEF, shrub, tree.

INTRODUÇÃO

Savanas são ecossistemas com camadas descontínuas de arbustos e árvores de crescimento e desenvolvimento intimamente influenciados pelas variações sazonais, em um gradiente de formações campestres a formações herbáceas (Frost et al., 1986). A vegetação savânica mais rica no mundo em biodiversidade está no bioma do Cerrado brasileiro (Coutinho, 1978). Esse ecossistema abrange uma área de 204 milhões de hectares distribuídos em mais de 10 Estados.

No Brasil, o termo Cerrado é comumente utilizado para se referir ao complexo fisionômico que se distribui desde formações florestais e savanas a campestres. Os solos do Cerrado, em sua maioria, têm boa drenagem, baixa fertilidade, alta acidez e teores elevados de Al³⁺ (Haridasan, 1992). O clima tropical estacional da região é marcado pelo período de *déficit* hídrico que pode chegar a sete meses (Silva et al., 2001).

A baixa disponibilidade de alguns nutrientes minerais, alta irradiação solar e alta temperatura alteram o balanço de C das plantas e demanda grande investimento em estruturas subterrâneas e estratégias para superar condições estressantes (Franco & Lüttge, 2002; Larcher, 2004).

A produção de compostos fenólicos é uma estratégia adaptativa comumente utilizada por plantas do Cerrado durante o seu crescimento e desenvolvimento. Os compostos fenólicos são sintetizados, primeiramente durante a rota do ácido chiquímico, e desempenham várias funções importantes na planta como o fortalecimento mecânico de parede celular e a defesa contra patógenos (Di Stasi, 1996; Taiz & Zeiger, 2004).

A formação de micorrizas é uma importante adaptação radicular que auxilia as plantas na absorção de nutrientes e água do solo pela associação simbiótica mutualística entre fungos e suas raízes. O benefício da associação para a planta surge do aumento da extensão da superfície de absorção, enquanto, em troca, o fungo é subsidiado por carboidratos fotoassimilados (Herrman et al., 2004). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) não são específicos e têm habilidade para infectar ampla gama de plantas. Contudo, o grau de benefício entre os associados depende das espécies de fungos e plantas envolvidas. As micorrizas também atuam como componente-chave na estruturação de ecossistemas ao possibilitar a comunicação de duas ou mais plantas através das hifas fúngicas (Wardle, 2002). Em programas de reflorestamento, a inoculação de espécies vegetais com fungos micorrízicos também tem sua importância prática ao contribuir para o crescimento vegetal e

reduzir os impactos das condições estressantes (Martins et al., 1999).

A presença de fungo endofítico do tipo *dark septate* (DSEF) nas raízes das plantas é outro tipo de associação simbiótica, que está relacionada a condições abióticas como umidade e comprimento do dia (Barrow & Aaltonen, 2001). Contudo, o benefício da associação com os DSEFs para a planta hospedeira ainda não é totalmente conhecido, apesar de estudos terem demonstrado que eles podem apresentar uma associação mutualista similar à das micorrizas (Lingfei et al., 2005).

As dificuldades da realização de estudos científicos com espécies vegetais do Cerrado vão desde sua coleta até as atividades laboratoriais, justificando o pequeno número de trabalhos encontrados na literatura realizados *in loco*. Como exemplo, pode-se citar a dificuldade em visualizar as estruturas fúngicas no sistema radicular dessas espécies, devido, sobretudo, à sua intensa lignificação e pigmentação. Esses compostos resistem ao processo de clarificação em KOH, e a coloração com azul-de-tripano é dificultada por estrutura química semelhante à da parede fúngica (Brundrett et al., 1996). Apesar de esses autores recomendarem o prolongamento de tempo em KOH para a remoção dos compostos fenólicos, eles ressaltam que alguns segmentos radiculares podem ser fragmentados ou simplesmente podem não clarear.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a associação micorrízica de diferentes espécies nativas do Cerrado *sensu stricto* denso e testar métodos laboratoriais para visualização de estruturas fúngicas em seu sistema radicular.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo e espécies vegetais

As espécies foram coletadas na Floresta Nacional de Paraopeba-MG, situada nas coordenadas geográficas de 19° 20' S de latitude e 44° 20' W de longitude. As amostras foram coletadas em julho de 2006, em Cambissolo Vermelho-Amarelo no Cerrado *sensu stricto*.

Em três repetições, raízes finas do sistema radicular de *Alibertia edulis*, *Aeschynomene paniculata*, *Chamaecrista desvauxii*, *Chamaecrista nictitans*, *Coccocypselum* sp., *Eugenia dysenterica*, *Miconia albicans*, *Myrsine guianensis*, *Palicourea* sp., *Platypodium elegans*, *Tapirira guianensis*, *Xylopia aromatica* e *Zornia diphylla* foram coletadas. Cada repetição constituiu-se de uma amostra composta de raízes finas de um indivíduo, coletadas com solo numa profundidade e raio de 10 cm ao redor do indivíduo. Em seguida, o solo foi retirado delicadamente em água corrente, com manuseio individual de cada fragmento de raiz, para sua imediata fixação em FAA₇₀ % (Johansen, 1940).

Preparação do material radicular

Para cada espécie, amostras de fragmentos de raízes foram submetidas a três métodos de clarificação. No método 1, foi realizada a clarificação dos fragmentos de raízes pela imersão em KOH 10 %, e autoclavagem a 121 °C, por 20 min, seguida de submersão em uma nova solução de KOH 10 %, por 24 h, em temperatura ambiente, e posteriormente de lavagem em água corrente (Phillips & Hayman, 1970). No método 2, os fragmentos foram imersos em KOH 10 % em banho-maria a 90 °C, por 2 h, depois transferidos para uma nova solução de KOH 10 %, por 24 h, em temperatura ambiente, e então para uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio amoniacal (NH₄OH 0,5 % e H₂O₂ 0,5 % em água) por 2 h também, em temperatura ambiente (Bevege, 1996). No método 3, os fragmentos foram clarificados conforme Koskey & Gemma (1989) modificando KOH 2,5 % por KOH 2 %. As amostras foram autoclavadas a 121 °C em KOH 2 %, por 20 min, com subsequente transferência para outra solução de KOH 2 %, por 24 h, em temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido por duas vezes e, em seguida, essas amostras foram imersas em H₂O₂ 2 % por 2 h.

Após a clarificação, as amostras dos métodos 2 e 3 foram neutralizadas em HCl 1 % por 24 h, e posteriormente coradas com azul-de-tripano 0,05 % (1:1:1- ácido láctico, glicerol, água) em banho-maria a 70 °C, por 15 min (Brundrett et al., 1996). Amostras do método 1 permaneceram em temperatura ambiente por 24 h, em azul-de-tripano 0,05 % (Phillips & Hayman, 1970).

Para a avaliação dos métodos, os segmentos de raízes finas processados foram coletados aleatoriamente para montagem de lâminas. As características de clarificação, fragmentação e coloração da raiz com azul-de-toluidina foram avaliadas segundo classificação em ausente, pouco, mediano e intenso segundo Carneiro et al. (1998). O comportamento geral foi avaliado em análise de variância conduzido pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$).

Os arbúsculos e compostos fenólicos foram avaliados pela análise de fragmentos radiculares das espécies, seccionados em micrótomo semi-automático e corados em azul-de-toluidina 0,05 %, pH 4,7 (O'Brien et al., 1964), após desidratação alcoólica e inclusão em Historesina Leica.

Determinação da frequência de colonização do sistema radicular

Os fragmentos radiculares selecionados foram montados em polivinil lactoglicerol (PVLG) (Koske & Tessier, 1983) na direção perpendicular ao eixo longitudinal da lâmina de microscopia. A presença de micorrizas foi observada no aumento de 400 vezes em microscópico óptico (OLYMPUS AX70). Para a categorização quanto à colonização, as espécies foram

classificadas em muito alta, alta, média, baixa e ausente, quando apresentavam grau de colonização > 80 %, 79–50 %, 49–20 %, 19–1 %, 0 %, respectivamente, segundo Carneiro et al. (1998).

RESULTADOS

O método 1 proporcionou boa clarificação dos fragmentos de raízes das espécies *C. nictitans*, *C. desvauxii*, *P. elegans*, *Palicuria* sp. e *Z. diphylla*. Entretanto, observou-se fragmentação intensa em *C. nictitans*, *Palicuria* sp., *T. guianensis*, *X. aromatica* e *Z. diphylla* (Quadro 1). No método 2, também foi observada elevada fragmentação das raízes, com

exceções de *P. elegans* e *C. desvauxii*. Apenas *A. paniculata* e *A. edulis* não tiveram raízes totalmente clarificadas pela utilização desse método (Quadro 1). No método 3, as raízes apresentaram-se com pouca ou nenhuma fragmentação, com descoloração mediana, exceto em *Coccocypselum* sp., *C. nictitans*, *C. desvauxii*, *P. elegans*, em que a clarificação foi pouca, considerando a escala estabelecida (Quadro 1).

Todas as espécies avaliadas apresentaram associação micorrízica evidenciada pela presença de vesículas, hifas e, ou, arbúsculos de FMAs. A frequência média de colonização variou com a espécie de planta (Quadro 2). Em geral, a frequência de colonização por FMAs foi maior nas herbáceas do que nas arbóreas (Quadro 2).

Quadro 1. Escores para clarificação (D), fragmentação (F) e coloração (C) das diferentes espécies vegetais de Cerrado, avaliadas em função do método de clarificação de raízes

Espécie	Método 1 ⁽¹⁾			Método 2 ⁽¹⁾			Método 3 ⁽¹⁾		
	D	F	C	D	F	C	D	F	C
<i>A. paniculata</i>	+	+	++	0	+++	++	++	0	++
<i>A. edulis</i>	+	+	+	+	+++	+	++	0	++
<i>C. desvauxii</i>	++	+	++	++	+	++	+	+	++
<i>C. nictitans</i>	++	+++	++	++	+++	++	+	+	++
<i>Coccocypselum</i> sp.	0	0	0	++	+++	++	+	+	++
<i>E. dysenterica</i>	+	+	+	++	+++	+	++	0	++
<i>M. albicans</i>	+	+	+	++	+++	+	++	0	++
<i>Myrsine</i> sp.	0	0	++	++	++	++	++	0	++
<i>Palicuria</i> sp.	++	+++	++	++	+++	++	++	+	++
<i>P. elegans</i>	++	+	++	++	+	++	+	+	++
<i>T. guianensis</i>	+	+++	++	++	++	++	++	0	++
<i>X. aromatica</i>	0	+++	++	+++	+++	++	++	0	++
<i>Z. diphylla</i>	++	+++	++	++	+++	++	++	+	++

⁽¹⁾ A descrição reflete a média dos fragmentos observados, de acordo com a escala. 0: ausência; +: pouco; ++: mediano; +++: intensa (Carneiro et al., 1998).

Quadro 2. Análise de frequência de colonização micorrízica (Fr), índice de frequência de colonização micorrízica (IF), segundo Carneiro et al. (1998), e presença de fungo endofítico do tipo *dark septate* (DSEF) em segmentos radiculares de espécies vegetais de Cerrado

Espécie	Família	Hábito	Fr	IF	DSEF
			%		
<i>A. paniculata</i>	Leguminosae	arbórea	65,0	alto	presente
<i>A. edulis</i>	Rubiaceae	arbóreo	41,5	médio	presente
<i>C. desvauxii</i>	Leguminosae	herbáceo	81,0	muito alto	presente
<i>C. nictitans</i>	Leguminosae	herbáceo	90,0	muito alto	presente
<i>Coccocypselum</i> sp.	Rubiaceae	herbáceo	86,0	muito alto	presente
<i>E. dysenterica</i>	Myrtaceae	arbóreo	28,0	médio	presente
<i>M. albicans</i>	Melastomataceae	arbóreo	39,9	médio	presente
<i>M. guianensis</i>	Myrsinaceae	arbóreo	76,0	alto	presente
<i>Palicuria</i> sp.	Rubiaceae	arbóreo	56,5	alto	presente
<i>P. elegans</i>	Leguminosae	arbóreo	30,0	médio	presente
<i>T. guianensis</i>	Anacardiaceae	arbóreo	55,0	alto	não
<i>X. aromatica</i>	Annonaceae	arbóreo	31,5	médio	não observado
<i>Z. diphylla</i>	Leguminosae	herbáceo	40,5	médio	não observado

As espécies apresentaram em suas raízes FMAs a morfologia tipo *Paris* (Figura 1e,e) e *Arum* (Figura 1g,h), não havendo destaque para freqüência de nenhuma forma.

A análise de cortes dos fragmentos radiculares proporcionou melhor visualização das estruturas fúngicas (Figura 1h) do que os fragmentos submetidos à clarificação (Figura 1g). Compostos fenólicos foram observados em cortes de fragmentos radiculares de *A. edulis* (Figura 1i).

As espécies *A. paniculata*, *A. edulis*, *C. desvauxii*, *C. nictitans*, *Coccocypselum* sp., *E. dysenterica*, *M. albicans*, *M. guianensis*, *Palicuria* sp. e *P. elegans*

encontravam-se colonizadas por DSEFs, evidenciados pela presença de microsclerócios e hifas típicas, coexistindo com FMAs em um mesmo fragmento radicular (Figura 1b,d). Não foi observada a presença de DSEFs em *X. aromatica*, *T. guianensis* e *Z. diphylla*

DISCUSSÃO

A produção de compostos fenólicos é uma estratégia adaptativa comumente utilizada por plantas do Cerrado durante o seu crescimento e desenvolvimento. Esses compostos resistem ao processo de clarificação

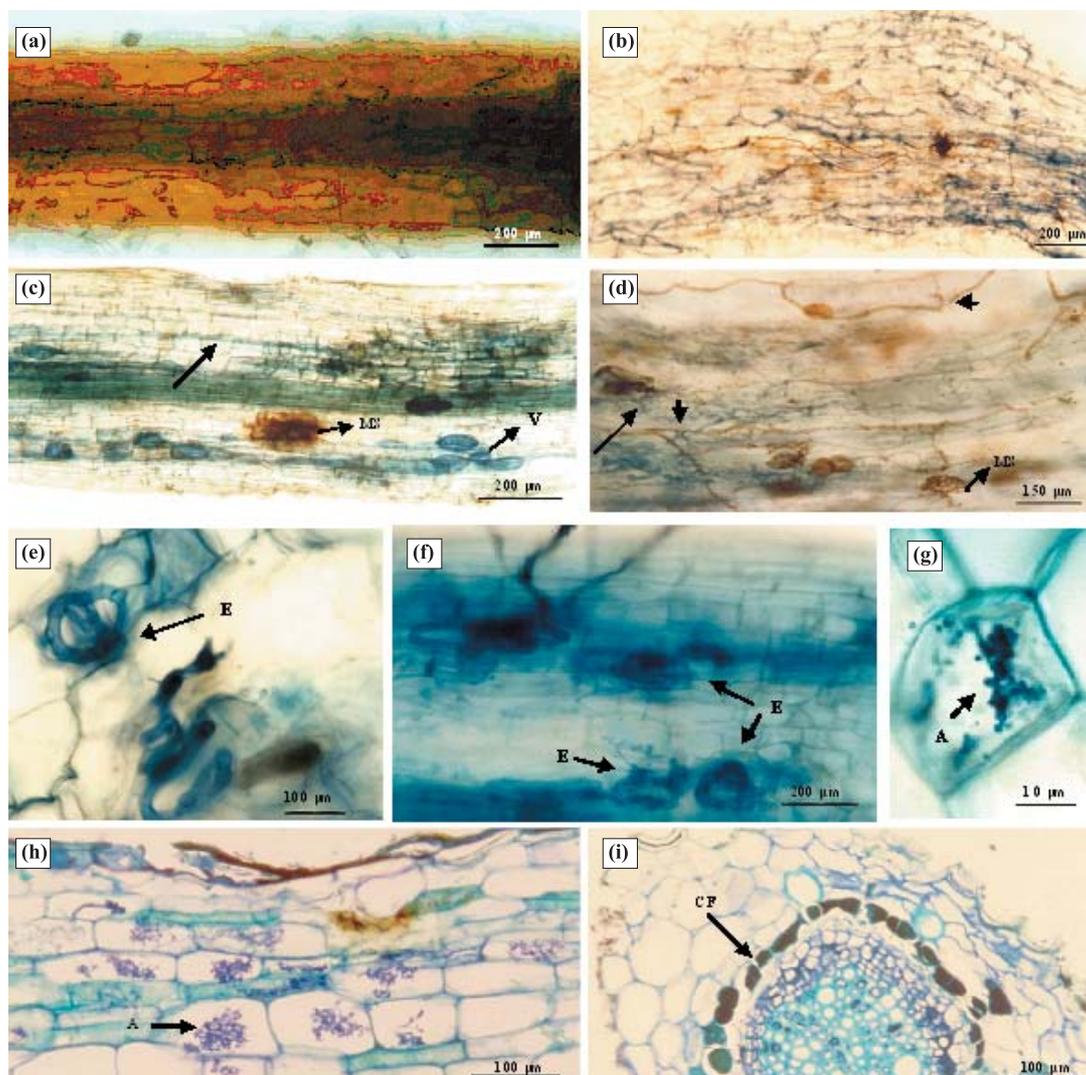


Figura 1. Caracterização de segmentos radiculares de espécies de Cerrado. Fotos a–g: fragmentos submetidos à clarificação. Fotos h–i: corte longitudinal (h) e transversal (i) corados com azul-de-toluidina. a: raiz de *C. desvauxii* com região pigmentada. b: hifas de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e fungos endofíticos do tipo *dark septate* (DSEFs) na raiz de *P. elegans*. c: raiz de *A. edulis* com presença de microsclerócito (MS) e vesículas (V). d: hifas de FMAs e DSEFs em raiz de *Coccocypselum* sp. e–f: raiz de *A. edulis*, apresentando enovelados (E) do tipo *Paris*. g–h: raiz de *M. albicans* (g) e *X. aromatica* (h), apresentando arbúsculo do tipo *Arum* (A). i: compostos fenólicos (CF) na raiz de *A. edulis*.

com KOH e são corados por azul-de-tripano. O processo de coloração das estruturas fúngicas com azul-de-tripano também promove a coloração dos compostos fenólicos por esses possuírem estrutura química similar à da melanina, que está presente nas paredes celulares de fungos (Brundrett et al., 1996). Apesar de recomendarem o prolongamento do tempo de imersão em KOH para a remoção dos pigmentos fenólicos da raiz, conforme advertem os autores, alguns segmentos se fragmentaram ou simplesmente suas paredes celulares não foram clarificadas por esse método (Quadro 1).

A fragmentação foi o fator determinante para a seleção do método de clarificação das raízes, sendo o método 3 aquele que proporcionou menor fragmentação dos segmentos radiculares das espécies estudadas ($p < 5\%$) (Quadro 1). As únicas espécies que não tiveram seus fragmentos radiculares danificados em KOH 10 %, em banho-maria, foram *P. elegans* e *C. desvauxii*. Como uma hora em banho-maria a 60 °C equivale a 5 min em autoclave e a solução de KOH 10 % fragmentou totalmente as raízes nas duas condições (Brundrett et al., 1996), isso pode ser um indicativo de que KOH 10 % foi excessivo para tais espécies e não necessariamente o tempo de exposição.

Bevege (1996) sugeriu solução alcalina de H₂O₂ como eficiente para a remoção de compostos fenólicos, com ressalva de que o tempo necessário para a remoção total dessa solução varia entre as amostras. Compostos fenólicos foram observados em cortes de *A. edulis* processados em historesina (Figura 1i). Esse método não se presta à quantificação de colonização micorrízica por avaliar secções, mas permite observar estruturas fúngicas delicadas. Como a raiz dessa espécie não se clarificou adequadamente no segundo método, mas sim no terceiro, isso pode ser um indicativo de que a imersão por 2 h em solução alcalina de H₂O₂ não tenha sido suficiente.

A utilização de menor concentração de KOH por um período maior seguida de uma rápida submissão a H₂O₂ (método 3) proporcionou o melhor conjunto de resultados: pouca fragmentação e ótima clarificação na maioria das espécies (Quadro 2). A menor intensidade de injúrias confirma as observações de Koskey & Gemma (1989), que sugeriram a concentração de 2,5 % de KOH para diminuir o risco de fragmentação das raízes. Contudo, a necessidade de pós-descoloração com H₂O₂ para a retirada de compostos fenólicos pode alterar estruturas delicadas dos fungos, principalmente os arbúsculos. Isso justifica o menor número de arbúsculos nas raízes pós-clarificadas (Figura 1g) em comparação com as raízes submetidas ao corte (Figura 1h).

As raízes das espécies nativas de Cerrado analisadas encontravam-se com alta taxa de micorrização. Isso confirma a ocorrência generalizada da colonização por FMAs em grande número de plantas nativas (Carneiro et al., 1998; Alvarenga et al., 1999; Carrenho et al., 2001). Além disso, pode ser um

indicativo de que a micorrização desempenha papel ecológico importante no crescimento e desenvolvimento vegetais em ambientes como o Cerrado (Siqueira, 2002).

A observação de estrutura fúngica nas treze plantas analisadas indica que os tipos *Paris* e *Arum* podem ser formados em plantas de Cerrado, embora Smith & Smith (1997) tenham sugerido uma preferência pelo tipo *Paris* em condições naturais. Dickson (2004) demonstrou igual dependência para hospedeiro e fungo ao realizar uma série de combinações de 12 plantas e seis fungos. Entretanto, não se pode concluir quanto à frequência morfológica dos FMAs nas raízes analisadas, uma vez que as espécies deste estudo podem estar colonizadas por diferentes espécies fúngicas.

As condições edáficas e climáticas de Cerrado *sensu stricto* ocasionam limitações ao crescimento e estabelecimento das espécies vegetais. A demanda evaporativa da atmosfera resulta em controle de transpiração e diminuição de taxas fotossintéticas em espécies do Cerrado por *feedback* (Franco & Lüttge, 2002). Apesar de as espécies arbóreas adultas possuírem sistemas subterrâneos que podem atingir lençóis freáticos profundos quando jovens, esses indivíduos têm que superar o estresse hídrico imposto pelos primeiros 2 m de profundidade de solo, semelhante às herbáceas (Carreira & Zaidan, 2003). Além disso, algumas espécies herbáceas investem em estruturas de resistência (bulbos e xilopódios) (Fahn & Cutler, 1992) ou rápido ciclo de vida. Tais estratégias adaptativas requerem elevada quantidade de custo de fotoassimilados (Dickson, 2000). A formação de micorrizas proporciona maior volume de solo explorado (Siqueira, 2002), podendo ser decisivo no estabelecimento e crescimento inicial de mudas de arbóreas e herbáceas por aumentar a disponibilidade de nutrientes e água, fundamentais na geração e transporte de fotoassimilados (Martins et al., 1999). A frequência de colonização micorrízica nos dois estratos vegetais foi mediana a muito alta, sugerindo sua importância no Cerrado *sensu stricto*.

Entre as espécies estudadas, não foram observadas estruturas típicas de DSEFs nas espécies *T. guianensis*, *X. aromatica* e *Z. diphylla* (Quadro 2). Embora existam opiniões conflitantes quanto à denominação adequada dessa associação, micorriza ou não, quando observados, os DSEFs coexistiram com FMAs nas espécies estudadas (Figura 1b,d). Li & Guan (2007) também observaram a coexistência de FMAs e DSEFs em espécies de *Pedicularis*. Esta proximidade confirma a íntima relação entre tais fungos, seja de cooperação a ou de competição. Infelizmente, as estruturas dos DSEFs apresentavam-se marrom-claro ou transparentes após a coloração com azul-de-tripano devido a sua baixa concentração de quitina nas paredes celulares (Barrow & Aaltonen, 2001). Assim, os DSEFs, por possuírem hifas hialinas, podem passar despercebidos devido à ausência de coloração. Assim, não foi possível verificar dominância

fúngica pelo procedimento utilizado neste trabalho, pois poderia haver uma subestimação do valor real de colonização de DSEFs nas raízes das espécies (Li & Guan, 2007).

CONCLUSÕES

1. O método 3, que consiste em autoclavar as raízes a 121 °C em KOH 2 %, por 20 min, com subsequente transferência para solução nova de KOH 2 %, por 24 h, em temperatura ambiente, por duas vezes, imersa em H₂O₂ 2 %, por 2 h, é o mais indicado para o estudo de micorrização das espécies nativas de Cerrado *sensu stricto*.

2. É freqüente a coexistência de fungos micorrízicos arbusculares e fungos endofíticos do tipo *dark septate* nas raízes das espécies nativas do Cerrado *sensu stricto*.

3. Mais estudos são necessários para confirmar a maior taxa de micorrização em herbáceas comparadas às arbóreas em Cerrado.

AGRADECIMENTOS

Ao técnico de nível superior Gilmar Edilberto Valente e ao Professor João Augusto Alves Meira Neto, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, pelo auxílio na coleta e na identificação das espécies vegetais. Ao Professor Edenio Detmann, do Departamento de Zootecnia da UFV, pela orientação nas análises e interpretações estatísticas.

LITERATURA CITADA

- ALVARENGA, M.I.N.; SIQUEIRA, J.O. & DAVIDE, A.C. Teor de carbono, biomassa microbiana, agregação e micorriza em solos de Cerrado com diferentes usos. *Ci. Agrotec.*, 23:617-625, 1999.
- BARROW, J.R. & AALTONEN, R.E. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*, 11:199-205, 2001.
- BEVEGE, D.I. A rapid technique for clearing tannis and staining intact roots for detection of mycorrhizas caused by *Endogone spp.* and some records of infection in Australasian plants. *Transactions of the British Mycological Society*, 51:808-810, 1968.
- BRUNDETT, M.C.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T. & MALAJCZU, N. Working with mycorrhizas in forest and agriculture. Gamberra, Austrália, ACIAR, Pirie, 1996, 374p.
- CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; CARVALHO, D.; BOTELHO, S. & ORIVALDO JÚNIOR, J.S. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. *Cerne*, 4:129-145, 1998.
- CARREIRA, R.C. & ZAIDAN, L.B.P. Estabelecimento e crescimento inicial de *Miconia albicans* (Sw.) Triana e *Schizocentron elegans* Meissn., sob fotoperíodos controlados. *Hoehnea*, 30:155-161, 2003.
- CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B. & BONONI, V.L.R. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosferas de três espécies de fitobiontes instaladas em área de mata ciliar revegetada. *Acta Bot. Bras.*, 15:115-124, 2001.
- COUTINHO, L.M. O conceito do Cerrado. *R. Bras. Bot.*, 1:17-23, 1978.
- Di STASI, L.C., Org. Plantas medicinais: Arte e ciência, um guia para uma pesquisa interdisciplinar. São Paulo, Universidade estadual de São Paulo, 1996. 230p.
- DICKSON, S. The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytol.*, 163:187-200, 2004.
- DICKSON, W.C. Integrative plant anatomy. San Diego, Harcourt Academic Press, 2000. p.295-337.
- FAHN, A. & CUTLER, D. Xerophytes. Berlin, Gebruder Borntraeger, 1992. 180p.
- FRANCO, A.C. & LÜTTGE, U. Midday depression in savanna trees: Coordinated adjustments in photochemical, efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia*, 131:356-365, 2002.
- FROST, P.; MEDINA, E.; MENAUT, J.C.; SOLBRIG, O.; SWIFT, M. & WALKER, B. Responses of savannas to stress and disturbance. *Biol. Int.*, 10: 1-82, 1986.
- HARIDASAN, M. Observations on soils, foliar nutrient concentration and floristic composition of Cerrado and cerrado communities in central Brazil. In: FURLEY, P.A.; PROCTOR, J. & RATTER, J.A., eds. Nature and dynamics of forest-savanna boundaries. London, Chapman & Hall, 1992. p.171-184.
- HERRMAN, S.; OELMMULLER, R. & BUSCOT, F. Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum* influence on plant development and photosynthesis. *J. Plant Physiol.*, 161:509-17, 2004.
- JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book, 1940. 523p.
- KOSKE, R.E. & TESTIER, B. A convenient permanent slide mounting medium. *Mycol. Soc. Am. Newsl.*, 34:59-63, 1983.
- KOSKE, R.E. & GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.*, 92:486-505, 1989.
- LACHER, W. Ecofisiologia vegetal. São Carlos, RiMa, 2004. 531p.

- LI, A.R. & GUAN, K.Y. Mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Pedicularis* species from Northwest of Yunnan Province, China. *Mycorrhiza*, 17:103-109, 2007.
- LINGFEI, L.; ANNA, Y. & ZHIWEI, Z. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in Southwest China. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54:367-373, 2005.
- MARTINS, C.R.; MIRANDA, J.C.C. & MIRANDA, L.N. Contribuição de fungos micorrízicos arbusculares nativos no estabelecimento de *Aristida setifolia* Kunth em áreas degradadas do Cerrado. *Pesq. Agropec. Bras.*, 34:665-674, 1999.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. & MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, 59:368-373, 1964.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br. Mycol Soc.*, 55:158-160, 1970.
- SILVA, D.B.; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V. & ANDRADE, L.R.M. Frutas do Cerrado. Brasília, Embrapa Informações Tecnológica, 2001. 179p.
- SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R. & STUMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares. *Biot. Ci. Desenv.*, 25:12-21, 2002.
- SMITH, F.A. & SMITH, S.E. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol.*, 137:373-388, 1997.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3.ed. Porto Alegre, Artmed, 2004. p.316.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. & MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, 59:368-373, 1964.
- WARDLE, D.A. Communities and ecosystems: Linking the aboveground and belowground components. Princeton, Princeton University Press, 2002. p.457.